

MONOKLONALIS ANTITESTEK

VEAB-SYMPOSION

Szombathely, 1984. február 17.



VESZPRÉM
1984

MONOKLONALIS ANTITESTEK

VEAB-SYMPOSION

Szombathely, 1984.február 17.

V E S Z P R É M

1984.

Szerkesztette: István Lajos
Kovács István

Felelős kiadó: Nemezc Ernő, a VEAB elnöke
Készült: 300 példányban, a KATE sokszorosítójában
Felelős vezető: Báló Lajos

TARTALOM

	Oldal
ISTVÁN LAJOS: Megnyitó.....	5
NÉMETH PÉTER: A szomatikus sejthybridizáció és a monoklonális ellenanyagtermelés orvosbiológiai felhasználása.....	7
MONOSTORI ÉVA: A Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjában előállított monoklonális ellenanyagok.....	17
LÁSZLÓ GLÓRIA, RAJNAVÖLGYI ÉVA, BERTÓK ISTVÁN, VESZELY GIZELLA és GERGELY JÁNOS: Humán immunoglobulinokkal reagáló monoklonális ellenanyag felhasználása szerkezet- és funkció vizsgálatokra, valamint diagnosztikai célra.....	19
BALÁZS LUJZA: Monoklonális immunhistológiai vizsgálatok Hodgkin-kórban.....	25
MATOLCSY ANDRÁS: Monoklonális antitestek alkalmazása az akut leukaemiák diagnosztikájában.....	39

MEGNYITÓ

T. Hallgatóság!

A sajtóban és a szakfolyóiratokban gyakran emlegetett technikai és tudományos forradalomnak és az annak keretében zajló "biológiai robbanásnak" kétségkívül egyik legjelentősebb és legnagyobb jövőt ígérő eredménye a monoklonális antitestek előállítása és mindaz, ami mögötte van: a génszetszet eredményei, hybridomák előállítása, diagnosztikus célú monoklonális antitestek készítése. Mindez az elmúlt években forradalmasította az immuncytológiát és az immunhistológiát. A további lehetőségek ismerete pedig olyan perspektívát ígér, amelyet csak a sci-fi-khez szokott gondolkozásunkkal tudunk követni. A monoklonális antitestek therapiás felhasználása ma még távol áll a gyakorlatban dolgozóktól, pedig erről is egyre többet hallunk és olvasunk.

Kongresszusokon járva tapasztaltuk azt a hatalmas változást, amit a monoklonális antitestek bevezetése az acut leukaemiák osztályozásában, ill. a malignus lymphomák értelmezésében hozott. Abban a szerencsés helyzetben vagyunk, hogy az elmúlt 2 év alatt egyre gyakrabban kaptunk a POTE Kórbonctani Intézetétől olyan immuncytológiai- ill. immunhistológiai leleteket, amelyekben monoklonális antitestekkel történt vizsgálatokról, ezekre alapozott véleményekről olvashattunk. Egyre többet olvasunk és hallunk arról is, hogy a monoklonális antitestek mennyivel előnyösebbek a jelenleg használt immun-savóknál, - és azokról a lehetőségekről, amelyek a monoklonális antitestek adta új radio- immuno- assay-k, ill. az enzim- immuno - assay-k révén adottak.

Mi azonban nemcsak a haematológiai diagnosztikában vagyunk érdekeltek a monoklonális antitestek adta új helyzet megismerésében, hanem a transzfuziológiában is, így ez orvos-biológiailag nagyon jelentős készítmények - pl. az interferon monoklonális antitestekkel történő tisztításában is. Hasonlóképpen egészen új távlatokat nyitott a monoklonális antites-

tekkal történő tisztításában is. Hasonlóképpen egészen új távlatokat nyitott a monoklonális antitestek bevezetése a csontvelőtranszplantációban - pontosabban a transzplantatumban lévő immunkompetens sejtek kiiktatásában, ezzel a GVH-reakció elhárításában. Mindezzel csak azt akartam érzékeltetni, hogy a monoklonális antitestek nem hogy távol állnak a gyakorlattól, hanem egyre inkább részét képezik annak, - befolyásolják a gyógyítás helyzetét, előhaladását, sőt jövőjét is. Ezért vagyunk hálásak mai előadóinknak - akik a monoklonális antitestekkel foglalkozók hazai uttörői közé tartoznak, - hogy kérésünkre Szombathelyre jöttek és egy összefoglaló képet adnak nekünk a monoklonális antitestek orvosi alkalmazásáról.

Köszöntöm: - az MTA Szegedi Biológiai Központjából
Monostori Évát,

- az ELTE gödi Biológiai Állomásáról
László Glóriát és

- a POTE Körbonctani Intézetétől
Németh Pétert, Balázs Lujzát és Matolcsy
Andrást, utóbbiakat ugyis, mint régi munkatársainkat, - köszönöm, hogy eljöttek

és előadásokat vállaltak.

A mai továbbképző - tudományos konferenciától azt várjuk, hogy korszerű ismereteken alapuló szemléletet, áttekin-tést ad a monoklonális antitestek diagnosztikus és terápiás lehetőségeiről, jelentőségéről - és tovább erősíti az elméleti kutatóintézetek és a gyógyító osztályok kapcsolatát, együttműködését.

István Lajos
a VEAB haematológiai-onkológiai
munkabizottságának
elnöke

NÉMETH PÉTER:

A szomatikus sejthybridizáció és a monoklonális ellenanyagtermelés orvosi biológiai felhasználása

I. A szomatikus sejthybridek előállítása

A különböző szövetek sejtjeinek spontán fuziójára a múlt század első évtizedeiben figyeltek fel. Az első hiteles leírás Johannes Müller, német biológustól származott /akinek tanítványai közt számos, későbbi jelentős tudós volt, pl. Schwann, Virchow, Henle, Remark, Kölliker és Helmoltz/. Az észlelt jelenséget "polycariocytosisnak" nevezte el. A mikroszkópos vizsgálatok során különböző betegségekben figyeltek meg többmagvu óriássejtek képződését /Virchow/, Langhans /1868/ írta le a specifikus gyulladásokban kialakuló, mononukleáris sejtekből létrejött óriássejteket.

In vitro körülmények közt Lewis /1927/ figyelt meg spontán sejtfuziókat daganatsejtek tenyésztése kapcsán.

Barski, Sorieul és Cornefert /1960, 1961/ kísérelték meg először tudatosan létrehozni a szomatikus sejtek in vitro fuzióját. Okada /1957-1962/ UV fényel inaktivált Sendai vírussal fertőzött szövettenyészeteken irta le a fuziót.

Littlefield /1964/ dolgozta ki a hybrid sejtek szelektálásának módszerét, enzimihiányos mutáns sejt vonalak előállításával. Harris és Watkins és tőlük függetlenül ugyanabban az évben /1965/ Okada és Murayama létrehozták az első interspeciesz hybridákat inaktivált Sendai vírus segítségével.

Harris, Klein és munkatársaik /1969/ normál és daganatsejt fuzióját vizsgálták.

Ruddle, Bodmer, Miller, Siniscalco és Bootsma és munkatársaik a szomatikus sejthybridizációt, ezen belül a xenogén hybridák előállítását /elsősorban kínai hörccsög sejt vonalak felhasználásával/ a humán kromoszóma térképezésére használták fel /1971/. Az 1970-es évek végére a genetikai térképezés rutin módszerévé vált a különböző szomatikus hybridák előállítása és elemzése.

1. / A sejtfuzió létrejöttének biológiai alapjai:

Két különböző sejt gentikai anyagának keveredéséből létrejött, új, a szülőkre nem jellemző tulajdonságokat hordozó sejtet tekinthetjük hibrideknek.

Sejtfuzió indukálható in vitro körülmények közt a Ca^{++} ionmilieu megváltoztatásával baktériumokon.

A sejtmembránok micelláris strukturájának megváltoztatásával magasabbrendű szervezetek sejtjeinek fuzióját lehet létrehozni. Elsősorban azok a vírusok, melyek a sejtmembránba interkalálódnak /Sendai, Herpesvirus stb./ teszik lehetővé, hogy egymással szoros kontaktusban levő sejtek membránjai közössé váljanak és a maganyag kicserélődhessék.

Hasonló módon a különböző lipidek /lizolecitin, polietilén-glikol/ is a sejtmembránba beépülve, annak strukturáját megváltoztatva hozza létre a sejtfuziót. Mivel a folyamat ATP dependens, csak élő sejtekkel valósítható meg.

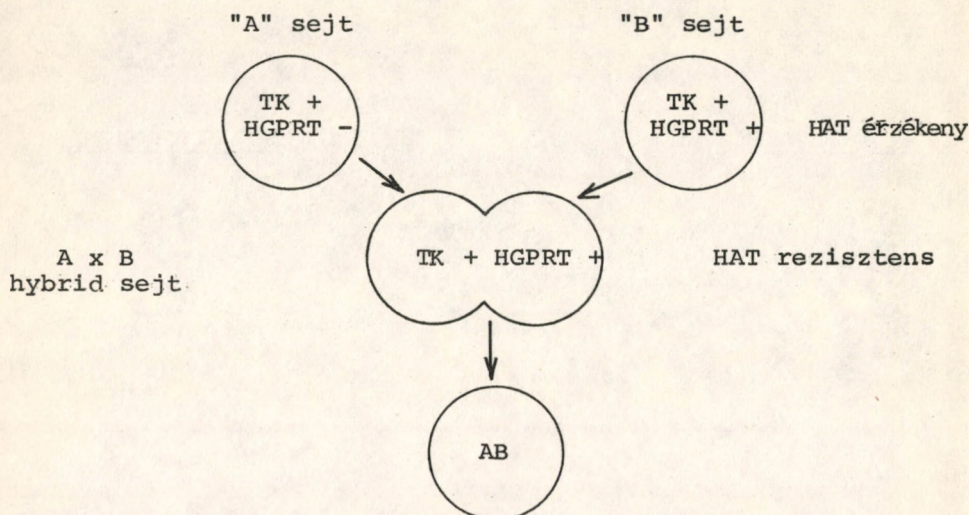
Tripszinizált sejtek /baktérium és növényi sejt esetén/ külső sejtfala eltávolítható és az így nyert, ún. protoplasztok fuzionáltathatók /magyar kutatók, Ferenczi és Alföldi dolgozták ki a protoplaszt fuzió módszerét/.

2. / A hybrid klónok szelektációja

A sejtfuzió létrejötte után a szövetkulturában nem-fuzionált sejtek mellett olyan többmagvu sejtek is találhatóak, melyek ugyanazon sejtpopulációból származnak. Különböző vizsgálatok szerint a fuzió után csupán 1-2 %-ban találhatóak a szövettenyészetben olyan hibridek, melyeket elő szándékozunk állítani. A nem fuzionált sejtekből /ill. az azonos sejtpopulációból származó fuzionáltaktól/ célszerű minél hamarabb megszabadulni, mert a sejt kulturában "tulnóvik" az általunk előállítani kívánt hibrideket. Erre a szelekcióra ad lehetőséget a mutáns, enzimhiányos sejt vonalak használata.

A hipoxantin-guanin-foszforibozil transzferáz /HGPRT/ ill. a timidin kináz /TK/ enzimekre nézve viszonylag könnyen funkcionális hiány építhető ki különböző sejt kulturákban. Az így deficiensé tett sejtek hipoxantin-aminopterin-timidin /HAT/ tartalmu tenyésztő médiumban élpusztulnak. A hybridizált sejtek viszont /mivel rendelkeznek a HAT bontó enzimekkel és így zavartalan bennük a purin és pirimidin nukleotidok szintézise/ szaporodni képesek ezen a tápoldaton is.

A felszaporított hybrid sejtek /ábrákon az "AB" sejtek/ további szelektálását a kívánt tulajdonságra különböző módszerekkel végezhetjük. Leggyakrabban az ún. limiting dilution /kelő mértékben kihígított sejtszuszpenzióból egy-sejt klónok ki-növesztésével/ módszerrel szelektálhatunk. Az így kapott ún. "monoklónok" genetikailag homogén sejtpopulációt eredményeznek.



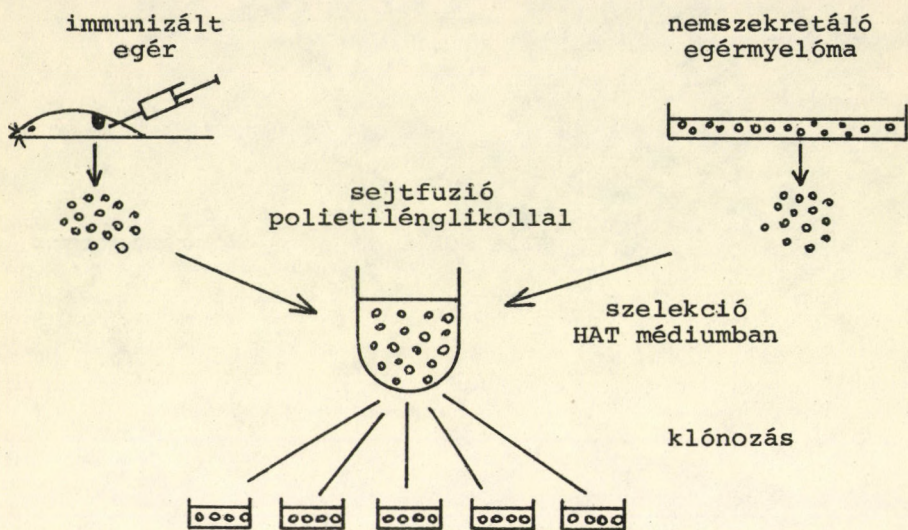
II. Monoklonális ellenanyagtermelés

Köhler és Milstein /1975/a szomatikus sejthybridizáció módszerét használták az immunoglobulinok könnyű láncának genetikai térképezésére. A variábilis és konstans szegmentum génjeinek "kapcsoltságát" tanulmányozták egér és patkány myeloma sejtek fúziójával. Olyan hybridet kívántak előállítani, melyben a könnyű lánc konstans régiója az egyik, variábilis régiója a másik állatra jellemző. Ilyen hybridet nem sikerült izolálniuk és ezzel bizonyították a két genetikai régió szoros kapcsoltságát.

Ezen alapkutatósi szintű vizsgálatok során vetődött fel annak a lehetősége, hogy a nemszekretáló egérmyelóma sejtet fuzionáltatni lehet normál plazmasejtekkel és így a képződött hybridekben az eredeti plazmasejt által termelt immunoglobulin gén-expressziójára lehet számítani.

Birka vörösvérsejtekkel BALB/c egereket immunizáltak, majd az eltávolított lépből preparált limfocitákat fuzionáltatták egy nemszekretáló, HGPRT egérmyelómával /NS-I jelű sejtvonallal/. A keletkezett hybrideket HAT médiumon szelektálták, majd az egyes klónok felüluszóját tesztelték birka vörösvérsejtekkel szemben. Így izolálni tudtak olyan klónokat, melyek a birka vörösvérsejtekkel reagáló, monoklonális immunoglobulint termeltek folyamatosan.

Az így immortalizált szomatikus sejtek /plazmasejtek/ egyetlen antigéndetermináns ellen termelnek, egyféle immunoglobulint. Mind in vitro körülmények közt /sejtkulturában/, mind szingén egérbe oltva /ascites tumorként/ fenntarthatók és korlátlan mértékben szaporíthatók.

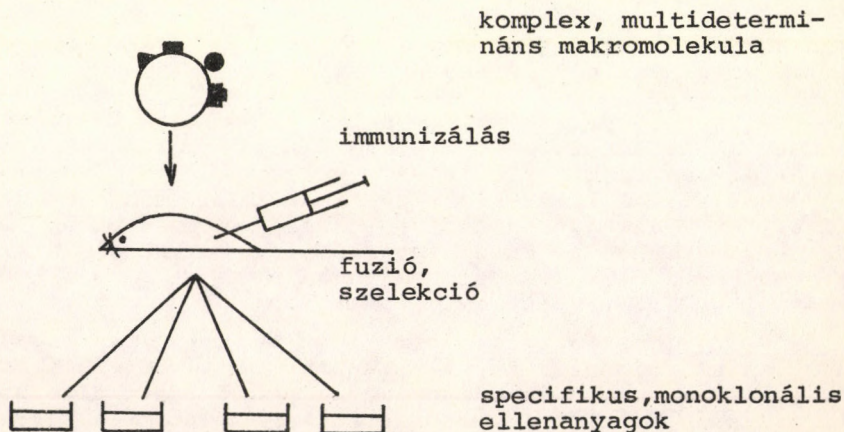


III. A monoklonális ellenanyagok felhasználása

A nagyfokú homológia és genetikai állandóság széleskörű felhasználást tesz lehetővé.

1. / Makromolekulák immunológiai térképezése:

Több antigéndeterminánssal rendelkező molekulák felszíni determináns csoportjait a hagyományos /poliklonális/ ellenanyagokkal nem lehet elkülöníteni. Monoklonális ellenanyagokkal azok az antigénstruktúrák is felismerhetővé tehetőek melyek a hagyományos módszerekkel nem váltanak ki mérhető immunválaszt a recipiensben.



2./ Biokémiai szeparálás, tisztítás:

Affinitás kromatográfiával kombinálva a specifikus monoklonális ellenanyag siegitségével keverékekből nagy tisztaságban állíthatók elő olyan anyagok, melyek kis koncentrációban vannak jelen. Hormonok, biológiailag aktív molekulák izolálásánál, ahol a hagyományos kromatográfiás eljárások nem alkalmazhatók /vagy lényegesen megdrágítják az előállítás folyamatát/ döntő szerep jut a monoklonális ellenanyagoknak. Ilyen módszerrel tisztították meg először a humán leukocita interferont is /Milstein, 1976/.

3./ Sejtfelszíni antigének kimutatása:

A makromolekulákhoz hasonlóan az élő sejtek felszínén lévő antigénekkal szembeni immunválasz eredendően poliklonális. Mivel a recipiens erős hisztokompatibilitási génkomplexe /az egyed immunogenetikai haplotípusa/ határozza meg az egyes antigéndeterminánsokkal szembeni immunválasz mértékét és irányát a hagyományos immunizálással előállított antitestekkel nehéz különbséget tenni a különböző sejtpopulációk közt. A monoklonális ellenanyagok előállítása során egyenlő esélye van az eredetileg "gyenge" antigéndeterminánssal szembeni ellenanyagot termelő klón előállításának az ún. "erős" antigénekkal reagálóval.

Számos munkacsoportban folytak /és folynak jelenleg is/ vizsgálatok a különböző szövetek sejtjeinek monoklonális ellenanyaggal történő jellemzésére. Ezek közül kiemelkedtek a limfocita felszíni markerek elleni monoklonális antitestek. Beverley, Kung, Goldstein, Reinholtz, Schlossman és Knapp /1979-1981/ munkássága eredményeként a T limfocita szubpopulációk jellemzésére, az egyes differenciálódási antigénekkal specifikusan reagáló monoklonálisok állnak rendelkezésre. Ezek a kereskedelemben is hozzáférhetőek, az Ortho cég OKT jelzéssel, a Beckton-Dickinson cég Leu jelzéssel hozza forgalomba.

Míg a T-sejt felszíni antigének jellemzésére 11 monoklonális ellenanyag a kereskedelmi forgalomban is hozzáférhető, a B-sejt szubpopulációkat jellemzők előállítása nehézségekbe ütközik. Stashenko, Nadler, Hardy és Schlossman /1980/ közölték a humán B limfocitákkal reagáló monoklonálisokról adatokat. Hazánkban Andó és munkatársai /1983/ állítottak elő emberi fehérvérsejtekkel specifikusan reagáló monoklonális ellenanyagokat.

4./ A monoklonális ellenanyagok és hybridómák az elméleti kutatásban

A szomatikus hybridizáció és ezen belül a monoklonális ellenanyagot termelő hybrid myelómák jó lehetőséget kínálnak az immunológiai alap kutatásban, mint modellek.

a./ immunológiaiilag aktiv sejtek immortalizálása:

A nemszekretáló myelóma és az immunizált egér lépsejtjeinek fúzióján kívül a módszer lehetőséget nyújt B x T, ill. T x T hibridek előállítására, klónozására és jellemzésére is. Ilyen jellegű vizsgálatokkal tisztázták /Jensenius és Williams, 1982/a T limfocita "antigén receptorok" struktúráját. Ezen munka során megállapították, hogy a T felszíni Ig receptorok nem rendelkeznek egy meghatározott idiotípussal. Ennek okát abban találták meg, hogy a T sejtek genomjában a variábilis domén kódoló szakasz inaktív /represszált/ formában van jelen.

Jelentős eredményeket hoztak azok a vizsgálatok, melyeket az emberi immunoglobulinok genetikai regulációját vizsgálták különböző hibridómák felhasználásával. Croce /1980/ és munkatársai bizonyították be, hogy a humán Ig nehéz lánc gén a 14-es kromoszómára lokalizált. Mekelä /1982/ a variábilis szakasz kódoló gének átrendeződését vizsgálta hibridómák segítségével. Green és munkatársai /1982/ Con-A stimuláció után T sejteket fuzionáltatott és limfokint /TSF/ termelő, valódi szupresszor sejt vonalat állított elő.

b./ az immunoglobulin termelés izolált vizsgálatára

Az in vitro és in vivo egyaránt tenyésztethető, ismert antigén specificitással és állandó Ig alosztály termeléssel rendelkező hibridóma sejt vonalak jó lehetőséget kínálnak az immunoglobulin termelés, intracelluláris transzport és szekréció vizsgálatára. Laboratóriumunkban szegregáns klónok /melyek Ig termelése a hibridómasejtek spontán szegregációja kapcsán károsodott/ felhasználásával térképeztük az un. "nemszekretáló myelómák" kialakulásának lehetséges mechanizmusait. Ennek kapcsán izoláltunk olyan sejt vonalakat, melyek defekt-immunoglobulinokat termelnek. A vizsgálatok során a rutin kórszövetekben gyakran észlelt intracitoplazmatikus immunoglobulin tartalmu zárványok, az un. Russell-testek létrejöttét is meg tudtuk figyelni in vitro körülmények között.

Az immunoglobulin termelés leállításában fontos szerepet játszó anti-idiotipus szabályozásra hívta fel figyelmünket az a kísérletsorozat, melynek során a hibridóma sejt növekedését vizsgáltuk a specifikus antigén jelenlétében in vitro és in vivo körülmények között. A specifikus antigénnel előimmunizálva az egereket a hibridóma in vivo növekedésgátlását tudtuk kiváltani.

Az antigénnel előimmunizált, hibridómával oltott hoszszan túlélő /az azonos sejtszámmal oltott kontroll csoporthoz viszonyítva 70-80 %-os túlélést tudunk elérni/ egerek szérumban keringő anti-idiotipus ellenanyagokat tudunk kimutatni a hibridóma által termelt monoklonális ellenanyagokkal szemben. Kórszövettanilag feldolgozva ezeket az egereket a nyirokszervekben a beoltott hibridóma sejtcső-

portok kimutathatók voltak, de a specifikus antigénnel indukált leállító immunválasz eredményeként "alvó" állapotban. Az így feltárt mechanizmus szerepet játszhat az emberi B-sejtes malignus lmfómák biológiai viselkedésében is és kiindulása lehet bizonyos therápiás próbálkozásoknak.

IV. A monoklonális ellenanyagok orvosi alkalmazása

A fent felsorolt alkalmazási területek mind az orvosi diagnosztika, mind a therápia új lehetőségeit nyitják meg.

1./ Diagnosztikus felhasználás:

A laboratóriumi diagnosztikában lehetőség nyílik olyan, egyéb módszerekkel nehezen meghatározható biológiai makromolekulák immunszerológiai kimutatására, mérésére, melyek más módszerekkel nem, vagy nehezen értékelhetők.

Monostori és munkatársai /1983/ az alfa-fötöproteinnel specifikusan reagáló monoklonális ellenanyagot állítottak elő, melynek alkalmazása lehetővé teszi a vizsgálatok egységesítését. A hagyományos módon előállított anti-alfafötöprotein használatakor ugyanis számolni kell az egyes preparátumok eltérő titerével, specificitásával.

Tigyi G. /1983/ a myelin bázikus protein mérésére alkalmas specifikus monoklonális ellenanyagot állított elő.

Laboratóriumunkban 1982-ben a réz-cink prosztetikus csoportu szuperoxid dizmutáz enzimmal specifikusan reagáló monoklonális ellenanyagot szekretáló hybridómát hoztunk létre. Az ellenanyag segítségével a szérumban mérhetővé vált az egyébként enzimatikusan inaktív formában jelenlevő SOD. Az enzim aktivitás és enzim termelés párhuzamos vizsgálatát tette lehetővé ez a monoklonális ellenanyag.

A diagnosztikus felhasználásban figyelembe kell venni az immunszerológiai módszerrel mérni kívánt biomolekula sajátosságait. Míg pl. a monoklonális ellenanyag a béta-HCG esetében a molekula egyetlen antigéndeterminánsát detektálja és így más hormonok kémiaiilag hasonló csoportjaival keresztreakciókat ad és így a mérést befolyásolja, addig a hagyományos immunizálással előállított poliklonális ellenanyag a béta-HCG-re legjellemzőbb antigéndeterminánsok együttesét mutatja ki. Így, látványosan a poliklonális ellenanyagok, bizonyos esetekben alkalmasabbak a rutin immunszerológiai diagnosztikus vizsgálatokra. A nehézséget jelentő egyetlen antigéndetermináns miatt kialakult keresztreakciók lecsökkenthetők olyan monoklonális ellenanyagok keverékének használatával, melyek az adott molekula legjellemzőbb csoportjai ellen termelődtek. Így kellő higitásban a keresztreakciók elhanyagolhatók, ugyanakkor a monoklonális ellenanyag nyújtotta állandó minőség garantálható.

Immunhisztológiában a sejt felszíni antigéndeterminánsok kimutatása jelent új diagnosztikus lehetőséget, elsősorban a vérképző szervi megbetegedések /ezen belül is a leukémiák/ esetén.

Az in vivo /radiológiai és izotópos/ diagnosztikában elsősorban a tumorok lokalizációjában játszhat szerepet a monoklonális ellenanyagok használata. Próbálkozások történtek az anti-alfafötöproteinnel /izotópos jelölés után/ hepatómák, ill. heretumor metasztázisok kimutatására.

2./ Therápiás felhasználás:

A monoklonális ellenanyagok nagy előnye, hogy ugyanaz az ellenanyag használható fel therápiás célra, amivel a diagnózis felállítása történt. Így az adott megbetegedés patomechanizmusába közvetlen beavatkozásra nyílik lehetőség.

Elsősorban a tumoros jellegű megbetegedések esetén számolnak be a különböző munkacsoportok eredményes therápiás beavatkozásokról.

Prentice, Jánossy és munkatársaik /1982/ az akut GvHD reakció kivédésére alkalmaztak monoklonális ellenanyagot. Az OKT3 /pánT/ jelű monoklonális ellenanyaggal inkubálták a beadás előtt a csontvelőt. Így a benne levő citotoxikus T-sejtek felszínét "telítették" az ellenanyaggal. Beadás után a beteg makrofág rendszere ezeket a sejteket a keringésből eliminálta és 17 beteg közül 15-ben nem fejlődött ki heterológ csontvelő adás ellenére a GvHD reakció.

Haemoblastozisok kezelésében alkalmazták először a betegbe, infúziós kezelés formájában közvetlenül beadott monoklonális ellenanyagokat. Ritz /1981/, Miller /1981/, Miller és Levy /1981/ különböző, leukémiás vérképpel járó malignus limfómás megbetegedésekben eredményesen alkalmazott monoklonális ellenanyagokkal specifikus therápiát. Ezek az esetek mind T-sejtes folyamatok voltak. Lynch és Beverley /1983/ kemotherápiával kombinálva végzett eredményes, hosszú remisszióhoz vezető kezelést monoklonális ellenanyag felhasználásával. A B-sejtes folyamatokban /részben a B-specifikus ellenanyagok hiánya miatt/ kevesebb az eredményes therápiás beavatkozásról szóló irodalmi közlés. Ezekben az esetekben az anti-idiotipus ellenanyag megtermeltetése és therápis felhasználása látszik járható utnak /Miller, 1982/.

Ezen therápiás próbálkozásokban nem észleltek allergiás szövődeményeket. A laboratóriumunkban előállított a-HLC-4 jelű monoklonális ellenanyag /steril és pirogénmentes formája/ sem okozott kóros reakciót a betegen, akinek a leukémia sejtjei ellen termeltettük az ellenanyagot a bőrpróbák során. Ezek az ellenanyagok komplementet nem fixáltak, nem citotoxikus Ig alosztályba tartoztak. Az elmúlt időszakban történtek próbálkozások citotoxikus monoklonális ellenanyagok felhasználására is.

Mig a haemoblastozisok esetén elgendő a keringő leukémia-sejteket a beadott monoklonális ellenanyaggal "opszonizálni", azok elpusztítását a saját makrofág-monocita rendszer végzi, addig a szolid tumorok kezelésében az ellenanyagnak elsősorban "carrier" funkciója lehet: az antitesthez /mely a tumor-sejttel specifikusan kapcsolódik/ citosztatikumot, vagy más erősen sejtkárosító anyagot kapcsolnak. A monoklonális ellenanyagok specificitása ezekben az esetekben tovább fokozható egy avidin-biotin kapcsolat révén /a monoklonális ellenanyaghoz avidint kötnek és beadják a beteg keringésébe, majd bizonyos idő elteltével - amire a nonspecifikusan kötődött ellenanyag kiürülésére már számítani lehet - beadják a biotinizált citotoxikus szert/. Így a tumor területében a korábban alkalmazhatónak sokszorosára fokozható a citosztatikum koncentrációja úgy, hogy közben a normál szövet kevésbé károsodik.

A szolid tumorok kezelésében elsősorban az anti-melanoma, az anti-colorectalis carcinoma antigén, az anti-glioma, az anti-érintő carcinoma antigén és az anti-prostata carcinoma antigén monoklonális ellenanyagok kerültek eddig felhasználásra. Immunodeficienciák esetén biztató próbálkozások történtek, elsősorban az anti-idiotipus ellenanyagok hybridómával történt előállításával segítségével. Krónikus thyreoiditis esetén Matsuyama és munkatársai /1983/ az anti-thyreoglobulin autoantibody ellen termeltettek monoklonális ellenanyagot. Az emberi terápiás felhasználásnak gátat szabtak azok a félelmek, melyeket az egér immunoglobulinokkal szembeni idegenkedés okozott. A humán-humán hibridek előállítását lassították azok a technikai akadályok melyek a jól szaporítható, nemszekretáló, HGPRT⁻ emberi eredetű sejtvonalak kialakításánál jelentkeztek.

Az elmúlt időszakban csökkentek azok az etikai megfontolások, melyek az egér eredetű immunoglobulinok terápiás felhasználását nehezítették, hiszen az egér IgG és az emberi között csupán néhány aminosav a különbség. További lehetőséget jelent a monoklonális ellenanyagokból preparált Fab2 fragmentum használata /mely nem hordoz fajspecifikus sajátosságokat, hipervariábilis régiója viszont érintetlen/. A humán-humán hibridek által termelt monoklonálisok felhasználása során viszont számolni kell azzal, hogy olyan, emberre nézve patogén vírusokat vihetünk be a beteg szervezetébe, melyeket kontrollálni nem tudunk. /Elvégre a humán-humán hibrid alapja egy eredetileg emberi eredetű daganatsejt!/ Mindezek a megfontolások jogosulttá teszik a monoklonális ellenanyagok egyre szélesebb körű felhasználását a gyógyító tevékenység során /Kozbor és Roder, 1983/.

MONOSTORI ÉVA:

A Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai
Központjában előállított monoklonális ellenanya-
gok

Az MTA Szegedi Biológiai Központjában, a Genetikai Intézetben folyó immunológiai kutatások során, 1979 óta az alap-
kutatásban, a klinikai gyakorlatban és a mezőgazdaságban felhasznál-
ható monoklonális ellenanyagokat állítottunk elő.

1983-ig az alábbi monoklonális ellenanyagok kerültek for-
galmazásra az általunk előállítottak közül:

I. Humán sejtfelszíni antigénekkal reagáló ellenanyagok

- | | |
|------------|-----------------------------------|
| 1. Le-My 5 | /myeloid elemekkel, monocytákkal/ |
| 2. Le-Mo 3 | /monocytákkal/ |
| 3. Thr 4 | /thrombocyták, megakaryocyták/ |
| 4. Le 5 | /leukocyták/ |
| 5. Le-T 3 | /érett T lymphocyták/ |

II. Humán fehérjékkel reagáló ellenanyagok

- | | |
|-----------|--------------------------|
| 1. AFP-1 | /alfa-1-foetoprotein/ |
| 2. AFP-33 | /alfa-1-foetoprotein/ |
| 3. MBP-19 | /myelin bázikus fehérje/ |
| 4. MBP-34 | /myelin bázikus fehérje/ |
| 5. HSA-5 | /humán szérum albumin/ |

/Az AFP-1 és az AFP-3, valamint az MBP-19 és MBP-34 megkü-
lönbötetés két egymástól eltérő antigéndeterminánssal reagáló
ellenanyagot jelöl./

III. Hormonokkal reagáló ellenanyagok

- | | |
|-----------|----------------------------|
| 1. ACTH-4 | /adrenocorticotrop hormon/ |
| 2. VSP-3 | /vasopressin/ |

IV. Speciális célu monoklonális ellenanyagok

- | | |
|-----------|---|
| 1. RSA-1 | /patkány szérum albumin/ |
| 2. GPA-11 | /szarvasmarha leukózis virus glikoproteinnel/ |
| 3. Tl-10 | /tubulin elleni/ |
| 4. GG-3 | /kecske gamma globulin/ |

A monoklonális ellenanyagok segítségével analitikailag tiszta /jódozásra alkalmas/ fehérjék előállítása is történt. 1983-ban az alábbi humán fehérjéket forgalmaztuk:

1. Alfa-1-foetoprotein /AFP/
2. Myelin bázikus fehérje /MBP/

A monoklonális ellenanyagok hazai elterjedését eddig jelentősen gátolta, hogy a gyakorlatban jól alkalmazható ellenanyagok csak valutáért, korlátozott mennyiségben szerezhetők be. A Genetikai Intézetben nagy mennyiségben és tisztaságban előállított monoklonális ellenanyagokkal ezen a helyzeten szeretnénk segíteni, amikor ezek forgalmazását vállaljuk. A széleskörű felhasználási lehetőségek hosszú sorából elég megemlíteni a velőcső záródási rendellenességek diagnosztizálásában felhasználható anti-AFP-t, a szarvasmarha leukózis vírus kimutatására alkalmas anti-GPA-11-et, vagy az immunhisztológiai vizsgálatokra alkalmas humán sejtfelszíni antigénekkal reagáló ellenanyagainkat.

A meglévő szellemi és eszközkapacitás lehetővé teszi új, speciális igényeket is kielégítő monoklonális ellenanyagok előállítását.

LÁSZLÓ GLÓRIA, RAJNAVÖLGYI ÉVA, BERTÓK ISTVÁN, WESZELY GIZELLA
és GERGELY JÁNOS:

Humán immunglobulinokkal reagáló monoklonális ellen-
anyagok felhasználása szerkezet- és funkció vizsgálá-
latokra, valamint diagnosztikai célra

Az emberi ellenanyag-molekulák ellen hagyományos immuni-
zálással előállított antisavók esetében - még ha megfelelően
tisztított immunglobulin preparátumot használunk is az immu-
nizáláshoz, bár egyes alosztályok esetében már a tisztítás
sem könnyű feladat - különböző ellenanyag osztályok és alosz-
tályok között lévő nagyfokú szerkezeti homológia miatt /mi-
vel az IgG alosztályok esetében az aminosavak sorrendjének
azonossága 90 % feletti/ viszonylag nehéz feladat megfelelő
specifitású immunszérumot nyerni. A különböző IgG alosztá-
lyok esetében a sejthibridizációs technika alkalmazása is csak
jól megválasztott immunizálási stratégiával hozhat létre megfelelő el-
lenanyagot termelő klónt /Lowe, 1982. Immunol. 47:329/.

Ugyanakkor az IgG ellenanyag-osztály esetében nemcsak az
egyes alosztályokba tartozó immunglobulinokkal specifikusan
reagáló immunszérumot nehéz előállítani, de a különböző osz-
tályok esetében a molekulákon található eltérő számú és erő-
ségű antigén determináns miatt olyan antiszérum készítése sem
könnyű, amelyik egyformán képes jól kötni mind a négy IgG al-
osztályba tartozó fehérjét. Ezért a forgalomban lévő, ellena-
nyagokkal reagáló antiszérumok általában kisebb-nagyobb mérték-
ben, de különbséget tesznek az egyes ellenanyag-osztályok és
alosztályok felismerésében. Ez a tény pedig diagnosztikus prób-
lémákat okozhat mind a myelomák esetében a monoklonális szapo-
rulat, mind a szelektív immunglobulin, deficienciák kimutatásá-
nál, illetve az ellenanyag-szintek mennyiségi meghatározásánál.

Mivel az IgG myelomák esetében a B limfociták lényegében
azonos sejtérési stádiumban vannak, mai tudásunk alapján a mo-
noklonális szaporulat IgG alosztály tulajdonságának megállapi-
tása sem a klinikai kép, sem a terápiás lehetőségek szempontjá-
ból nem jelent hasznos többlet információt. Ezzel szemben sze-
lektív ellenanyaghiány esetében az egyes ellenanyag-osztályok
ill. alosztályok jelentése vagy hiánya más-más vírus vagy bak-
térium fertőzéssel szemben jelenthet védettséget vagy védtelen-

séget. Ennek oka egyrészt az, hogy a különböző immunglobulin sztályba és alosztályba tartozó ellenanyagok az immunrendszer más-más eliminációs mechanizmusában képesek hatékonyan részt venni, ennek megfelelően a különböző sejttípusokon eltérő az őket kötő Fc receptorok száma és affinitása, különbözőképpen tudnak kapcsolatba lépni a komplement rendszerrel, eltérő a memória-sejt generáló hatásuk stb. Más oldalról pedig az antigén kémiai szerkezetétől, a szervezetbe kerülés módjától, ill. az adott szervezet genetikai sajátosságaitól függően a képződő ellenanyagoknak nemcsak mennyiségük és affinitásuk, de osztály és alosztály megoszlásuk is különböző lehet. Vírusok ellen főleg IgG1 és IgG3, míg a szénhidrát típusu baktériumfal antigének ellen főleg IgG2 típusu ellenanyagok termelődnek /Hammarström 1983, Clin. Exp. Immun. 51, 600; Morell 1983. Infect. Immun. 39, 565/. Autoimmun eredetű immundeficiencia esetén az IgG típusu autoantitest a placentán keresztül bekerülve a magzatba, ott B sejt érési zavarokat okozhat /Hammarström, 1983. Scand. J. Immun. 18, 509/.

Az egyes betegségcsoportok genetikai hátterének vizsgálata közben egyre több kutatócsoport talált szoros összefüggést bizonyos, eddig elsősorban autoimmun eredetű kórképekben a betegség előfordulási valószínűsége és az IgG molekulák allotípus determinánsai, az ún. Gm specificitások között /Nakao, 1980. Clin. Exp. Immun. 42, 20/. Idekapcsolódóan érdekes adat, hogy míg a hepatitis B antigén fertőzést követően a szervezet reakciója /igy az antigén hordozóvá válás ill. a kialakuló betegség típusa/ néhány HLA antigénnel, míg a krónikus hepatitisből cirrhozison keresztül primer hepato carcinoma létrejötté elsősorban Gm specificitásokkal hozható kapcsolatba /Nakao, 1983, Clin. Exp. Immun. 52, 493/. Az IgG allotípus tulajdonság és a különböző IgG alosztályok szérum szintje között egészséges donorokban is összefüggést találtak /Shakib, 1982, Immunogenet. 9, 149/.

Ezekhez a kutatásokhoz jól karakterizált izotípus ill. allotípus specifikus ellenanyagokra, jól használható módszerekre van szükség. Néhány, az európai populációban elég gyakori Gm specificitás vizsgálata az ún. izoallotípus determinánsok miatt /olyan antigén determináns, amelyik az egyik IgG alosztály esetében csak valamelyik allotípusra jellemző, míg a másik esetében minden molekulán megtalálható/ a hagyományos immunszérumok segítségével és általánosan alkalmazott haemagglutináció gátlásos módszerrel nagyon nehezen oldható meg. Egy jól megválasztott izotípus és egy allotípus specifikus monoklonális ellenanyag kombinált alkalmazásával a probléma áthidalható /Zelaschi, 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3762/.

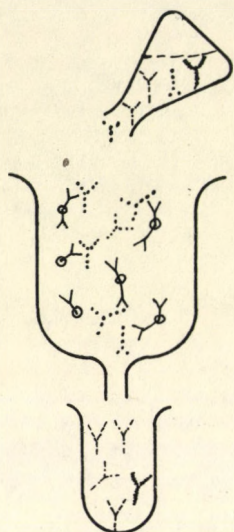
Tekintettel arra, hogy a monoklonális ellenanyagok egy-egy jól meghatározható determinánssal képesek specifikusan reagálni, attól függően, hogy ez a determináns az ellenanyag-molekula melyik részén van, illetve, melyik típusu molekulára jellemző, - ezek az ellenanyagok ill. keverékük többféle célra is jól használható:

- Alkalmasak az ellenanyag-molekula szerkezetének pontos feltérképezésére, törzsfajlódási vizsgálatokra.
- A megfelelő módon és meghatározott körülmények között alkalmazott izotípus, allotípus ill. idiotípus specifikus ellenanyagok képződésének szuppressziója és stimulációja kis kiváltható /Bona 1979, J. Exp. Med. 149, 815; Milburn, 1983, Mol. Immun. 20, 931/. Megfelelően kiválasztott monoklonális ellenanyagok in vivo és in vitro funkcionális vizsgálatokra egyaránt alkalmasak; ilyen módon T és B sejteken közös idiotípus determináns előfordulásakor az egyes antigénekkal szembeni immunválasz komplex szabályozására is /Moorhead, 1982, J. Immun. 128, 113/. Ezek a vizsgálatok felvetik egy későbbi terápiás alkalmazás lehetőségét is.
- A monoklonális ellenanyagok segítségével jó hatásfokkal megoldható az ellenanyag preparátumok tisztítása, - adott esetben a különböző immunglobulin osztályok, alosztályok szétválasztása immunszorbens technika segítségével /1. ábra/.
- Diagnosztikai szempontból széleskörűen alkalmazhatók az egyes immunglobulin osztályok és alosztályok mennyiségi és minőségi meghatározására. A vizsgálatok céljára alkalmazott módszerek megválasztásánál /radio-immunoassay, enzim-immunoassay, haemagglutináció, immunfluoreszcencia, komplement kötési teszt, precipitációs módszerek, stb./ természetesen tekintettel kell lenni az adott monoklonális ellenanyag pontos finomspecificitásából, aviditásából és izotípus sajátosságából következő tulajdonságaira.

Laboratóriumunkban az elmúlt év folyamán humán IgM-mel és IgG-vel specifikusan reagáló monoklonális ellenanyagokat állítottunk elő. Ellenanyagaink specificitását eddig szilárd fázisu kompetitív radioimmunoassay segítségével vizsgáltuk. Eredményeink alapján a tizenegy IgM molekulát kötni képes ellenanyag finomspecificitás szempontjából három csoportba osztható: csak a teljes IgM molekulával; a teljes IgM molekula Fc részével és izolált nehézlánccal képesek kapcsolódni. Keverékünk alkalmas lehet egyes vírusfertőzések hatására termelődött IgM kiutatására, így adott esetben intrauterin fertőzöttség lehetőségének megállapítására /2. ábra/.

Az IgG-vel reagáló monoklonálisaink közül az egyik egy osztályspecifikus determinánst ismer fel, így egyformán kimutatható vele mind a négy IgG alosztály. A fúzió során nyert másik molekulonális ellenanyag az IgG1 alosztályba tartozó fehérjéket specifikusan képes kötni. A két monoklonális ellenanyag kombinált alkalmazásával az IgG1 alosztály mennyisége a szérumban pontosan mérhető /3. ábra/.

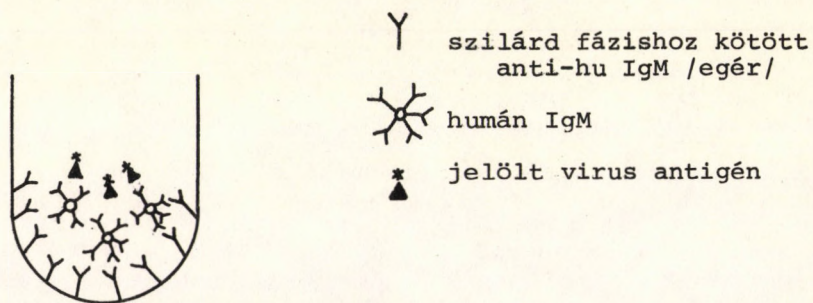
Könnyülánccal specifikusan reagáló monoklonális ellenanyagunk előnyös tulajdonsága, hogy egyformán felismeri a szabad és a kötött könnyüláncot is.



1. ábra

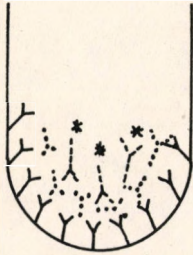
immunszorbens technika

2. ábra



szilárd fázisu indirekt
RIA vagy ELISA

3. ábra



- Y anti-hu IgG /egér/
- Y anti-hu IgG1 /egér/
- Y humán IgG
- * izotóp vagy enzim

szilárd fázisu "szendvics"
RIA vagy ELISA



szilárd fázisu kompetetiv
RIA vagy ELISA

BALÁZS LUJZA:

Monoklonális immunhistológiai vizsgálatok Hodgkin-kórban

BEVEZETÉS

Az intracytoplasmaticus, valamint sejtfelszíni immunglobulinok, egyéb fehérjék, enzimek immunhistológiai kimutathatóságának széleskörű elterjedése a malignus lymphomák pathomechanizmusának megismerésében új lehetőségeket tárt fel. Az elmúlt évek folyamán számos munkacsoport vizsgálatainak eredménye vált ismertté a Hodgkin-kór /HO/ immunhistológiai jellegzetességeiről is, a vizsgálatokhoz polyklonális /convencionális/ antitesteket használtak, részben az óriássejtek, részben környezetük tanulmányozására /16, 24, 9, 31, 28, 33, 36, 1, 29, 26, 8, 21/. Ezek az immunhistológiai leletek korántsem egységesek, emellett a vizsgálatok előterében az óriássejtek kerültek, így a HO-nak, mint egy komplex patológiai entitásnak vizsgálata háttérbe szorult.

Napjainkban egy újabb vizsgálómódszer, a monoklonális ellenanyagokkal történő immunhistológiai vizsgálatok válnak egyre elterjedtebbé, szerepük még nehezen felmérhető a lymphoid rendszer és a malignus lymphomák tanulmányozásában /4, 22, 27, 5, 15, 17, 20, 34, 41, 2, 19, 45/. A monoklonális antitestek használata lehetővé teszi a tumorsejtek eredetének pontos tisztázását, így a malignus lymphomák helyzetét a lymphoid rendszerben, a lymphocyták differenciálódásában, emellett lehetőség nyílik a tumort kísérő, vagy esetleges tumor-ellenes reakciók vizsgálatára, tehát a pathogenesis és a pathomechanizmus pontosabb megismerésére. A HO vonatkozásában a monoklonális immunhistologia alátámasztotta a sejtsuspensionokon, szöveteken a különböző vizsgálómódszerekkel nyert adatokat, melyek szerint a HO szövetekben a B/T-lymphocytaarány a T-sejtek javára tolódik el, ill. a T-suppressor sejtek relatív, vagy abszolút számban megemelkednek /23, 30, 60, 6, 3/. E módszer segítségével in situ lehetőség nyílik a különböző lymphocyta subpopulációk vizsgálatára, egymáshoz való viszonyuk megítélésére, a HO egyes szövettani subtypusainak összehasonlítására, a Sternberg-Reed óriássejtek és környezetük viszonyának megítélésére /7, 35/.

Vizsgálatainkban 31 HO eset monoklonális immunhistológiai elemzését végeztük el, T-lymphocytá és T-subtypus, B-lymphocytá, interdigitáló reticulumsejt, Ia, DR és transferrin receptor specificus monoklonális antiserumokat használva. Észleleteink arra utalnak, hogy a nodularis LP, valamint az NS és MC kórformák eltérő kóreredetűek, egyes T-lymphocytá subpopulációk arányának megváltozása a kórfejlődés irányát jelezheti, a T-suppressor sejtek számának megemelkedése éretlenebb szöveti képre, tehát feltehetően előnytelenebb klinikai lefolyásra utal. Az éretlenebb szöveti képet mutató esetekben a transferrin receptor pozitív sejtek magas száma a folyamat kifejezett proliferatív jellegét mutatja.

Anyag és módszer

Vizsgálatainkhoz kezeletlen betegekből származó nyirokcsomókat használtunk. A nyirokcsomók egy részét a rutin szövettani módszereknek megfelelően dolgoztuk fel. A diagnosztikus felállításán kívül a szöveti kép éretlensége megítélésé céljából meghatároztuk az össz lymphocytaszámot egyazon szövettani subtypuson belül. A biopsias minták másik részét folyékony nitrogénben lehűtött isopentanban gyorsfagyasztottuk, majd felhasználásig -70°C -on tároltuk, közvetlenül a felhasználás előtt 4-5 μm vastag cryostatos metszeteket készítettünk.

Monoklonális antitestek: T-lymphocytá és T-subpopulatio specificus antitestek a következők voltak: Leu 1:pan T, Leu 2a:OKT 8 szerű, T-suppressor/cytotoxicus specificus, Leu 3a:OKT 4 szerű, T-helper/inducer, Leu 5:E rosettát adó T-sejtek kimutatására szolgál, Leu 7:"natural killer" sejt /NK-sejt/ specificus/a fenti antitestek a Becton-Dickinson cég termékei/. A B-lymphocytákat a B 1/Coulter Electronics Inc./ antitesttel mutattuk ki. Macrophag specificus antitestként OKM 1, interdigitáló reticulumsejt specificusként OKT 6 antitesteket használtunk /Ortho Diagnostic Systems Inc./. A B3/25 /Hybritech/ antitest a transferrin receptorral rendelkező, proliferáló sejtek kimutatására alkalmas /OKT 9 szerű/. A HLA DR /Becton-Dickinson/ és OKIa /Ortho Diagnostic Systems Inc./ antitesteket a B-sejtek, aktivált T-lymphocyták, valamint macrophagok, histiocyták markerként alkalmaztuk. A második lépésben az immunperoxidase reakció folyamán tormagyökér-peroxidase jelzett antiegér-nyul heterolog antiserumot /DAKO immunoglobulins a/s/ használtunk.

Immunperoxidase reakció: A 4-5 μm vastag cryostatos metszeteket szobahőn, ventilátor alatt szárítottuk, majd 10 perccig acetonnal fixáltuk. Fixálás után ismét szárítás, majd PBS-Tween 20 mosás után a második antiserummal fél órán át incubáltunk, amit 2 x 10 perces PBS-Tween 20 és 10 perces acetat-pufferes /pH 4,6/ mosás követett. Chromogénként 9-amino-ethyl-carbazolt /Aldrich Chemical Company/ használtunk. Egy órás acetat-pufferes mosás után a metszeteket glicerin-zselatin oldattal fedtük le.

Észleletek

A rutin szövettani vizsgálatok alapján az esetek diagnózis szerint a következőképp oszlottak meg: lymphocyta praedominantia /LP/ 6/3 eset nodularis szöveti szerkezetet mutatott/, nodular sclerosis /NS/ 10, kevertsejtes /MC/ 13, lymphocyta depleti /LD/ 2, összesen 31 eset. Az egyes szövettani subtypusokon belül a HO-infiltrátumokban a lymphocyták előfordulását az 1. sz. táblázatban tüntettük fel.

1. táblázat

Diagnózis	A HO-infiltrátumok lymphocytáinak száma		
	sok	közepes	kevés
LP	6 eset	∅	∅
NS	3 eset	4 eset	3 eset
MC	7 eset	3 eset	3 eset
LD	∅	∅	2 eset

Immunhistológiai eredmények: Leu 1: A HO-infiltrátumokban az NS, MC és LD subtypusokban a lymphocyták jelentős része T antigenítés volt, az infiltrátumok, melyeket az óriássejtek jelenléte jelzett, csaknem teljes egészében T-lymphocytákat tartalmaztak. Az LP kórformákban az előző típusokhoz viszonyítva kevesebb T-lymphocyta volt kimutatható, ez a legszembetűnőbben az LP nodularis formáinál mutatkozott.

B 1: ezen antitesttel kimutatható sejtek száma a HO-infiltrátumokban csekély, elszórtan helyezkedtek el az NS és MC típusokban. Azonban az infiltrátumok mellett viszonylag jól körülhatárolt csoportokban voltak megtalálhatók, a csoportok nagysága változott, de úgy tűnt, hogy az össz lymphocytaszám csökkenésével a B-sejtes csoportok száma kevesebb, kisebb számú sejtet is tartalmaztak, LD-ban B-sejtes mezők csak elvétve láthatók. Ezzel szemben az LP nodularis formájában a B-lymphocyták - összehasonlítva az egyéb szövettani subtypusokkal - viszonylag nagy számban voltak jelen, a nodulusok területére lokalizálódtak.

Leu 2a: a T-suppresszor /Cytotoxikus sejtek a lymphocytadus formákban a szövettani subtypustól függetlenül viszonylag kis számban fordultak elő. Feltűnő volt azonban, hogy a számuk az össz lymphocytaszámmal fordított arányban változott, így a lymphocytaszegény NS, MC és LD esetekben számuk feltűnően megnövekedett.

Leu 3a: az infiltratumok területében a T-helper/inducer sejtek száma az egyéb sejtfeleségekhez viszonyítva nagyobb volt, azonban jól észlelhetően a lymphocytaszegény esetekben számuk lecsökkent. A nodularis LP kórformákban a nodulusok centruma viszonylag kevés Leu 3a pozitív lymphocytát tartalmazott, nagyobb számban a nodulusok peripheriáján jelentek meg.

Eeu 5: az infiltratumokban számos pozitív sejtet észleltünk, számuk az egyes subtypusokban, ill. az össz lymphocytaszám relációjában a Leu 3a pozitív sejtekéhez volt hasonló.

Leu 7: NK-sejtek a HO-infiltratumokban csak igen kis számban fordultak elő az NS, MC és LD csoportokban, feltűnően magas volt azonban a számuk az LP nodularis formájában.

OKM 1: ezen antitesttel látott pozitív reakció az infiltratumokban jelenlévő macrophagok, histocytaer elemek számától függött, magas volt az OKM 1 pozitív sejtek száma azokban az esetekben is, ahol az óriássejtek mellett az un. atypusos reticulumsejtek nagyobb számban vettek részt az infiltratum alkotásában.

OKIa: a B-lymphocytás mezőknek megfelelően minden sejt jelöltődött, az infiltratumok lymphocytáinak változó hányada adott pozitív reakciót aktivitásuk jelenként, ez a sejtpopuláció feltehetően a T-helper/inducer lymphocytáknak felelt meg /37/.

HLA-DR: a HO-infiltratumokban a szövettani subtypustól függetlenül csaknem minden sejtfeleség - lymphocyta, macrophag, óriássejt - pozitív reakciót adott.

B3/25: az LP subtypusban a transferrin receptor pozitív sejtek száma kevés volt. Az NS és MC altypusokban a B3/25 pozitívítást adó sejtek száma az össz lymphocytaszám csökkenésével, ill. a szöveti pleomorphismussal növekedett.

OKT 6: az infiltratumokban ezen antitesttel reagáló lymphocyta nem volt jelen. Azonban az NS, MC és LD typusokban, az infiltratumok területében változó számban látszottak a lymphocytáknál nagyobb, nyulványos, feltehetően interdigitáló reticulumsejteknek megfelelő sejtalakok. Az LP nodularis kórformákban a nodulusokon belül OKT 6 pozitív interdigitáló reticulumsejtek sosem fordultak elő.

Megbeszélés

A HO pathomorphológiájának, pathomechanizmusának, így immunológiai hátterének felderítésében a monoklonalis immunhistologia igen jelentős haladást jelent. Az utóbbi években két fontos közlemény vált ismertté, mely a monoklonalis antitestek felhasználásával a HO-infiltratumok felépítésével, a normális nyirokszövettől eltérő jellegzetességeivel foglalkozott /Borowitz és mtsai, 1982, 7, Poppema és mtsai, 1982, 35/. Ezen ismeretek alapján egyértelmű, hogy a HO-infiltratumok lymphocytái az esetek nagyobb részében T-helper sejtek, továbbá, hogy a suppresszor sejtek száma esetről-esetre változó, bár a hel-

per/suppressor arány az éretlenebb esetekben alacsonyabbnak látszik. Minthogy a monoklonális immunhistológiával vizsgált esetek száma még kevés, az egyes szövettani subtypusok jellemző vonásai egyértelműen még nem tisztázták, azonban a pathogenesis és pathomechanizmus vonatkozásában néhány kérdésben már jelentős megfigyelésekhez vezettek.

31 HO-kóros beteg nyirokcsomóinak gyorsfagyasztott metszetein végeztük el indirect immunperoxidase módszerrel a B-lymphocyták, T-sejtek, T-lymphocyta subpopulációk /helper/inducer, valamint suppressor/cytotoxikus/, macrophagok, interdigitáló reticulumsejtek, valamint transferrin receptorral rendelkező, feltehetően proliferáló sejtek kimutatását. Vizsgálati eredményeink a következőkben foglalhatók össze:

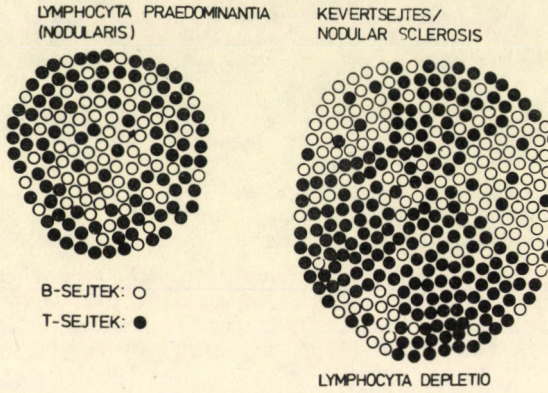
/1/ A HO-infiltrátumok lymphocytáinak jelentős része T-sejt antigenitású az NS, MC és LD kórformákban. A B-lymphocyták ezekben az esetekben jól körülhatárolt csoportokban, mezőkben voltak jelen, számuk, a csoportok nagysága esetenként változott. Ezzel szemben az LP nodularis formájában a B-lymphocyták a nodulusoknak megfelelően, viszonylag nagy számban mutatkoztak, T-sejteket részben a B-lymphocyták között fogyeltük meg, számuk a nodulusok peripheriáján feldusult /1. ábra/.

/2/ Különbőség észlelhető a T-lymphocyta subpopulációk megjelenési arányában az egyes szövettani subtypusokban és a szöveti össz lymphocytaszám változásával. Azokban az esetekben, ahol az össz lymphocytaszám még magas volt, a T-helper sejtek domináltak, számuk a szöveti éretlenséggel párhuzamosan csökkent, így a lymphocytaszegény esetekben a T-helper/suppressor arány csökkentnek tűnt, az LD esetekben a T-suppressor lymphocyták dominanciája volt szembetűnő. Az LP nodularis altypusban a T-sejtek T-helper/inducer lymphocyták voltak, suppressorok csak elvétve fordultak elő /2. ábra/.

Észleleteink alapján a következő feltételezések vehetők fel. Borowitz és mtsai /7/ szerint a HO-infiltrátumokban található kis lymphocyták, melyek B-sejt antigenitással rendelkeznek nem maradványszövetnek tekinthetők, hanem az infiltrátumok szerves részei. Észleleteink alapján azonban feltételezhető, hogy az NS, MC és LD típusokban a B-lymphocyták maradványszövetet képviselnek, hiszen az óriássejtek elsősorban a T-sejtes mezőkben találhatóak. Amennyiben B-sejtek között vannak jelen, úgy T-lymphocytákból álló gyűrű veszi őket körül. Ugy tűnik, hogy a HO-infiltrátumok progresszióját a B-sejtes mezők fokozatos T-lymphocytás inváziója jelzi, ahol már a T-zóna alkotóelemei, az OKT 6 pozitív interdigitáló reticulumsejtek is jelen vannak.

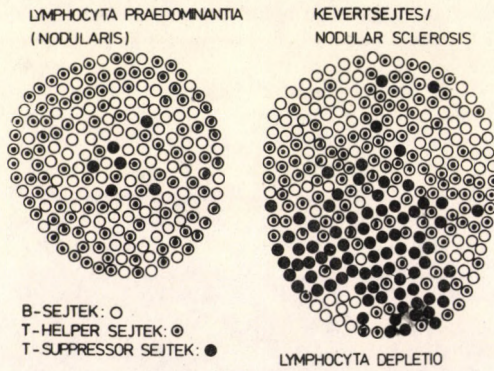
Ellentétben az előbbi kórformákkal, az LP nodularis subtypusban a B-lymphocyták viszonylag nagy számban, a nodulusoknak megfelelően helyezkedtek el, tömegesebb T-sejt a nodulusok peripheriáján volt található, interdigitáló reticulumsejtet a nodulusokban nem láttunk. Mindezek alátámasztják azt a korábbi feltevést, hogy az LP nodularis formája a progresszív tüszőkből származnak /32/. Ezen észleletek alapján felmerül

A HODGKIN-KÓROS INFILTRÁTUMOK FELÉPÍTÉSE



1. sz. ábra

LYMPHOCYTA SUBPOPULATIÓK MEGOSZTLÁSA A HODGKIN-KÓROS INFILTRÁTUMOKBAN



2. sz. ábra

annak a lehetősége, hogy az LP nodularis, valamint az NS, MC és LD subtypusba sorolt formák kóreredete eltér egymástól és a jelentősen különböző biológiai viselkedésük esetleg az eltérő immunológiai vonásokra vezethető vissza.

Külön figyelmet érdemel a helper és suppressor T-lymphocyták arányának változása az egyes subtypusokban, ill. egyes esetekre lebontva az össz lymphocytaszám függvényében. A T-helper sejtek előfordulási arányát a 2. táblázatban tüntettük fel, tekintettel az össz lymphocytaszámra. Ezen táblázat eredményeit összevetve az 1. táblázat adataival az tapasztalható, hogy szoros kapcsolat áll fenn az össz lymphocytaszám csökkenése és a T-helper sejtszám csökkenése között. Fordított helyzet látszik a T-suppressor sejttartalom tekintetében, az össz lymphocytaszám csökkenésével együtt jár a T-suppressor sejtszám növekedése /3. táblázat/. Nem tisztázható egyértelműen, hogy a T-helper/T-suppressor arány csökkenését a helper sejtszám lecsökkenése adja-e a változatlan suppressor sejtszám mellett, vagy a helper sejtszám csökkenése mellett a T-suppressor lymphocyták proliferációjával is számolnunk kell. Ismeretesek azonban olyan adatok, hogy nem Hodgkin malignus lymphomákban és egyéb tumorerő mellett is T-helper/T-suppressor arány csökkenés tapasztalható 44, 45/. Nem egyéértelmű tehát, hogy a helper/suppressor arány eltolódás /normál nyirokszövetben 4-2:1/ a HO-ra speciális jelenség-e, az arány csökkenése jelzi-e, jelentheti-e az alapbetegség előrehaladtát, a szöveti "dedifferenciálódást", vagy egy általános, tumort kísérő immunológiai folyamat részjelenségeként fogható-e fel. Azonban számos, a HO betegek lymphocytáinak jellemzésével foglalkozó vizsgálat inkább azt a lehetőséget támasztja alá, hogy a T-suppressor sejtek abnormis megjelenése a HO-ra jellegzetes, és ez az immunrendszer egészét érintő defectus lehet /25, 10, 12, 13, 14, 18, 5, 6/.

Az LP nodularis formájában a többi subtypussal ellentétben feltűnően sok Leu 7 pozitív /"natural killer" sejt, NK-sejt/ sejtet találtunk, az utóbbiakban /NS, MC, LD/ csak elvétve fordultak elő, bár Banarjee és mtsa /2/, és Ruco és mtsai /38/ HO infiltrált szövetekben fokozott NK-sejt aktivitást észleltek a tumor ellenes reakció jeleként. Más vizsgálatok szerint a centrum germinativumokban is fellelhetők az NK-sejtek, melyeknek reguláló szerep tulajdonítható /2/, így feltehetően, a még organoid strukturát mutató LP nodularis infiltratumban csak mint a természetes sejtalkotók szerepelnek. Egy általunk vizsgált, progresszív tüszőket tartalmazó hyperplasiás nyirokcsomóban egyes területekben, a tüszőknek megfelelően sok NK-sejt volt található, hasonlóan az LP nodularis formájához. Lehetséges továbbá, hogy az LP nodularis típusban, mint korai kórformában még jelen van a tumor-ellenes sejtreakció, mely a folyamat előrehaladtával fokozatosan lecsökken, eltűnik. Ugyanakkor az is feltételezhető, hogy az LP nodularis kórforma igen kedvező klinikai lefolyása hátterében a fokozott NK aktivitás jelenléte szerepel.

A Leu-3a pozitív sejtek száma az össz
lymphocytaszám függvényében

Dg	kevés	közepes	sok
LP	-	-	● ● ● ● ● ●
NS	-	● ○ x x x	● ● ○ ○ ○
MC	-	○ ○ x x x	● ● ● ● ● ● ● ○
LD	x	x	-

●: eset magas össz lymphocytaszámmal
○: eset közepes össz lymphocytaszámmal
x: eset alacsony össz lymphocytaszámmal

2. táblázat

A Leu-2a pozitív sejtek száma az össz
lymphocytaszám függvényében

Dg	kevés	közepes	sok
LP	● ● ● ● ● ●	-	-
NS	● ● ● ○ ○ ○	○ x x	x
MC	● ● ● ● ● ○	● ● ○ ○ x x	x
LD	-	-	x x

●: eset magas össz lymphocytaszámmal
○: eset közepes össz lymphocytaszámmal
x: eset alacsony össz lymphocytaszámmal

3. táblázat

Érdekes problémakört vet fel a transferrin-receptorral rendelkező sejtek kimutathatósága a HO-infiltrátumokban. Trowbridge és mtsai /43/ munkája alapján ismert, hogy a proliferáló sejtek felszínén transferrin receptorok mutathatók ki, melyeket a tumoros sejtek is tartalmaznak /42, 11/. A HO-kóros betegek vasanyagcsere zavara jól ismert, Sarcione és mtsai /39/ fokozott ferritin synthesist észleltek a betegek peripheriás lymphocytáin. Eseteink közül az LP kórformákban, valamint a lymphocytadus egyéb típusokban a transferrin receptor pozitív sejtek száma alacsony volt, azonban tömeges megjelenésüket észleltük az éretlenebb esetekben. Két lehetőség adódik e jelenség magyarázatára. Egyrészt lehetséges, hogy a proliferatív jelleget kimutató B3/25 pozitivitás megnövekszik a pleomorph esetekben, másrészt jelentheti egy kóros sejttársaság megjelenését a HO-infiltrátumokban /18, 7/, melyek a szöveti éretlenséggel előtérbe kerülnek. Egyenlőre nem ismeretes, hogy melyik lymphocytá alpopuláció felel meg a HO-infiltrátumokban a proliferáló, ill. abnormis sejteknek. E kérdés eldöntésére kettős jelölésű monoklonális immunhistológiai vizsgálatokat tervezünk.

A HO-ban lejátszódó immunhistológiai vizsgálatokkal kimutatható kóros eltéréseket egy-egy esetben, csak egy adott időszakban, a betegség diagnózisakor vizsgálhatjuk, a betegség során bekövetkező változások már alig követhetőek, az esetleges rebiopsziák immunhistológiai elemzése a kezeléseket követően már irreális eredményt adhat.

IRODALOM

- /1/ Balázs, L.: Intracellularis immunglobulinok lymphogranulomatosisban. *Morph, és Ig. Orv.Szemle*, 21/1, 59-63. 1981.
- /2/ Banarjee, D., Thibort, R.F.: Natural killer cells found in B-cell compartments of human lymphoid tissues. *Nature* 304, 270-272, 1983.
- /3/ Baroni, C.D., Ruco, L., Uccini, L., Foschi, S.: Tissue T-lymphocytes in untreated Hodgkin's Disease. Morphologic and functional correlations in spleen and lymph nodes. *Cancer* 50/2. 259-268. 1982.
- /4/ Beard, J., Reinherz, E.L., King, P.C., Goldstein, G., Schlossman, S.F.: A monoclonal antibody reactive with human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 124, 1943-1948. 1980.
- /5/ Berényi, E., Sonkoly, I., Kávai, M., Szegedi Gy.: Szuppresszor T-sejt markerek vizsgálata Hodgkin-kóros betegek perifériás vérében. *Magyar Belorvosi Arch.* 33, 309-314. 1980.
- /6/ Berényi, E., Sonkoly, I., Pálóczy, K., Balázs Gy., Szegedi Gy.: Marker vizsgálatok Hodgkin-kóros betegek nyirokcsomóból és lépből nyert lymphocytáin. *Magyar Onkológia* 24, 17-23. 1980.
- /7/ Borowitz, M.J., Croker, B.P., Metzgar, R.S.: Immunohistochemical analysis of the distribution of lymphocyte subpopulations in Hodgkin's disease. *Cancer Treat. Rep.* 66/4. 667-674. 1982.
- /8/ Crocker, J., Smith, P.J.: Immunohistochemical localisation of factor VIII-related antigen in Hodgkin's disease. *J. Clin. Pathol.* 37. 37-44. 1984.
- /9/ Curran, R.C., Jones, E.L.: Immunoglobulin in Reed-Sternberg and Hodgkin cells. *J. Pathol.* 126. 35-37. 1978.
- /10/ Del Giacco, D.S., Cengiarotti, L., Mathieu, A.: T-cell subsets in Hodgkin's disease as determined by monoclonal antibodies. *IRCS Med. Sci.* 10/9. 761-762. 1982.
- /11/ Faulk, W.P., Hsi, B.L., Stevens, P.J.: Transferrin receptors in carcinoma of the breast. *Lancet* 11. 390-392. 1980.
- /12/ Fauser, A.A., Bross, K.G., Kanz, L., Lohr, G.W.: Suppressor T-cell clones derived from pluripotent stem cells /CFU-GEEM/ of a patient with Hodgkin's lymphoma. *Blut* 45/2. 97-102. 1982.
- /13/ Fisher, R.I., Vanhaelton, C., Bostick, F.: Increased sensitivity to normal adherent to normal adherent suppressor cells in untreated Hodgkin's disease. *Blood* 57/2. 830-835. 1981.

- /14/ Fisher, R.I.: Implication of persistent T-cell abnormalities for the etiology of Hodgkin's disease. *Canc, Treat. Rep.* 66/4. 681-687, 1982.
- /15/ Fithian, E., Kung, P., Goldstein, G., Rubenfeld, M., Feniglio, C., Edelson, R.: Reactivity of Langerhans cells with Hybridoma antibody. *PNAS USA* 78, 2451-2544, 1981.
- /16/ Garvin, A.J., Spicer, S.S., Parmley, R.T., Muster, A.M.: Immunohistochemical demonstration of IgG in Reed-Sternberg and other cells in Hodgkin's disease *J. Exp. Med.* 139, 1077-1083, 1974.
- /17/ Greaves, M., Sutherland, D.D., Rao, J., Verbi, W., Kemshead J., Hariri, G., Goldstein, G., G., Kung, P.: Expression of the OKT monoclonal antibody defined antigenic determinants in malignancy. *Int. J. Immunopharmacol.* 3, 283-300, 1981.
- /18/ Gupta, S.: Subpopulations of human T-lymphocytes. XVI. Maldiistribution of T-cell subsets associated with abnormal locomotion of T-cells subsets in untreated adult patients with Hodgkin's disease. *Clin. Exp. Immunol.* 42, 186-195, 1980.
- /19/ Harrist, T.J., Bahn, A.K., Murphy, G.F., Sato, S., Berman, R.S., Gellis, S.E., Feedman, S.: Histiocytosis X. In situ characterization of cutaneous infiltrates with monoclonal antibodies. *Am. J. Clin. Patho.* 79/3. 294-300, 1983.
- /20/ Jánossy, G., Duke, O., Poluter, L.W., Panayi, G., Bofil, M., Goldstein, G.: Rheumatoid arthritis: a disease of T lymphocyte/macrophage immunoregulation. *Lancet* ii: 839-842. 1981.
- /21/ Kadin, M.E., Stites, D.P., Levy, R., Warnke, R.: Exogenous immunoglobulin and the macrophage origin of Reed-Sternberg Cells in Hodgkin's disease. *New Engl. J. Med.* 299/22, 1208-1214. 1978.
- /22/ Kadin, M.E.: Ia-like/ HLA-DR/ antigens in the diagnosis of lymphoma and undifferentiated tumors. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 104, 503-508. 1980.
- /23/ Kaur, J., Catovsky, D., Spicer, A.S.D., Galton, D.A.G.: Increase of T-lymphocytes in the spleen in Hodgkin's disease *Nature* 7884/2. 800-802. 1974.
- /24/ Landaas, T.O., Godal, T., Halvorsen, T.B.: Characterization of immunoglobulins in Hodgkin's cells. *Int. J. Cancer* 20. 717-722. 1977.
- /25/ Lauria, F., Foa, R., Gobbi, M., Camaschella, C., Lusse, P., Raspadori, D., Tura, S.: Increased proportion of suppressor /cytotoxic/OKT 8/ cells in patients with Hodgkin's disease in long - lasting remission. *Cancer* 52/8. 1385-1388. 1983.

- /26/ Mir, R., Kahn, L.B.: Immunohistochemistry of Hodgkin's disease Cancer 52, 2064-2071. 1983.
- /27/ Murph, G.F., Bahn, A.K., Sato, S., Harnist, F.J., Mihm, M.C.: Characterization of Langerhans cell by the use of monoclonal antibodies. Lab. Invest. 45/5, 465-468. 1981.
- /28/ Papadimitriou, C.S., Stein, H., Lennert, K.: The complexity of immunohistochemical staining pattern of Hodgkin and Sternberg-Reed cells - demonstration of immunoglobulin, albumin, alfa-1-antichymotrypsin and lysozyme. Int. J. Cancer 21, 531-541. 1978.
- /29/ Payne, S.V., Wright, D.H., Jones, K.J.M., Judd, M.A.: Macrophage origin of reed-sternberg cells: an immunohistochemical study J.Clin.Pathol. 35, 159-166. 1982.
- /30/ Pinkus, G.S., Barbuto, D., Said, J.W., Churchill, W.H.: lymphocyte subpopulations of lymph nodes and spleens in Hodgkin's disease Cancer 52, 1270-1279. 1978.
- /31/ Poppema, S., Elema, J.D., Halie, M.R.: The significance of intracytoplasmic proteins in Reed-Sternberg cells. Cancer 42, 1793-1803, 1978.
- /32/ Poppema, S., Kaiserling, E., Lennert, K.: Hodgkin's disease with lymphocytic predominance /nodular type/ nodular paragranuloma/ and progressively transformed germinal centres - a cytohistological study. Histopathology 3, 295-308. 1979.
- /33/ Poppema, S.: The diversity of the immunohistochemical staining pattern of Sternberg-Reed cells. J.Histochem, Cytochem 28/8. 788-791. 1980.
- /34/ Poppema, S., Bahn, A.K., Reinherz, E.L., McCluskey, R.T., Schlossman, S.F.: Distribution of T cell subsets in human lymph nodes. J.Exp.Med. 153, 30-41, 1981.
- /35/ Poppema, S., Bahn, A.K., Reinherz, E.L., Posner, R., Schlossman, S.L.: In situ immunologic characterization of cellular constituents in lymph nodes and spleen involved by Hodgkin's disease Blood 59/2, 226-232, 1982.
- /36/ Ree, H.J., Song, J.Y., Leone, L.A., Crowley, J.P., Fanger, H.: Occurrence and patterns of muramidase containing cells in Hodgkin's disease, non-Hodgkin's lymphomas and reactive hyperplasia. Human Pathol. 12/4. 49-59, 1981.
- /37/ Reinherz, E.L., Jung, P.C., Pesando, J.M., Ritz, J., Gkldstein G., Schlossman, S.F.: Ia determinants on human T cell subsets defined by monoclonal antibody: activation stimuli required for expression. J.Exp. Med. 150. 1472-1482, 1979.
- /38/ Ruco, L.P., Procopio, A., Uccini, S., Marcocelli, E., Baroni, C.D.: Natural killer activity in spleen and lymph nodes from patients with Hodgkin's disease. Canc. Res. 42, 2063-2068, 1982.

- /39/ Sarcione, E.J., Smalley, J.R., Lema, M.J., Stutzman, L.: Increased ferritin synthesis by Hodgkin's disease peripheral blood lymphocytes. *Int. J. Cancer* 20, 339-346, 1977.
- /40/ Shiftan, T.A., Caviles, A.P., Mendelsohn, J.: Spontaneous lymphocyte proliferation and depressed immunity in Hodgkin's disease. *Clin. Exp. Immunol.* 32, 144-152, 1978.
- /41/ Stashenko, P., Nadler, L.M., Hardy, R., Schlossman, S.F.: Characterization of human B lymphocyte specific antigen. *J. Immunol.* 125/4, 1678-1685, 1981.
- /42/ Trowbridge, I.S., Domingo, D.L.: Anti transferrin receptor monoclonal antibody and toxic antibody conjugates affect growth of human tumor cells. *Nature* 294, 171-173, 1981.
- /43/ Trowbridge, I.S., Omary, M.B.: Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation in the receptor for transferrin. *PNSA USA* 78, 3039-3043, 1981.
- /44/ Van der Valk, P., Jansen, J., Daha, M.R., Meijer, C.J.L.M.: Characterization of B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Virchows Arch.* 401/3, 289-305, 1983.
- /45/ Watanabe, S., Yuichi Sato, Kodoma, T., Shimasato, Y.: Immunohistochemical study with monoclonal antibodies on immune response in human lung cancer. *Canc. Res.* 43/12, 5883-5889, 1983.

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA

SZEGEDI BIOLÓGIAI KÖZPONTJA

Tájékoztató az alapkutatói és diagnosztikai célokra kifejlesztett monoklonális ellenanyagok (MEA) választékáról és forgalmazásáról

Az MTA SZBK Genetikai Intézetében folyó immunológiai kutatások során az alapkutatóban, a klinikai gyakorlatban és a mezőgazdaságban használható monoklonális ellenanyagokat (MEA) állítottunk elő. A monoklonális ellenanyagok hazai elterjedését eddig jelentősen gátolta, hogy a gyakorlatban jól alkalmazható ellenanyagok csak valutáért, korlátozott mennyiségben szerezhetők be. A Genetikai Intézetben nagy mennyiségben és nagy tisztaságban előállított MEA-termékek ma már széles körben alkalmazhatók lennének, amelyekre ezúton is szeretnénk az érdeklődők figyelmét felhívni.

A meglévő szellemi és eszközkapacitás lehetővé teszi új, speciális igényeket is kielégítő MEA-termékek előállítását.

Az alább felsorolt monoklonális ellenanyagokat már jelenleg is forgalmazzuk. A felhasználási lehetőségek hosszú sorából – amelyekről kívánságra részletes tájékoztatást adunk – elég megemlíteni a velőcső-záródási rendellenességek diagnosztizálását, a szarvasmarha leukózis vírus kimutatását vagy az immunhisztokémiai alkalmazás lehetőségeit.

MONOKLONÁLIS ELLENANYAGOK (1983)

I. Humán sejtfelszíni antigénekkal reagáló ellenanyagok

- | | |
|------------|--------------------------------|
| 1. Le-My 5 | (Myeloid elemek, monociták) |
| 2. Le-Mo 3 | (Monociták) |
| 3. Thr 4 | (Thrombociták, Megakariociták) |
| 4. Le 6 | (Leukociták) |
| 5. Le-T 3 | (Érett T-limfociták) |

II. Humán fehérjékkel reagáló ellenanyagok

- | | |
|-----------|--------------------------|
| 1. AFP-1 | (Alfa-1-foetoprotein) |
| 2. AFP-33 | (Alfa-1-foetoprotein) |
| 3. MBP-19 | (Myelin bázikus fehérje) |
| 4. MBP-34 | (Myelin bázikus fehérje) |
- (Az AFP-1 és AFP-33, valamint az MBP-19 és MBP-34 megkülönböztetés két egymástól eltérő antigéndeterminánssal reagáló ellenanyagot jelöl.)
- | | |
|----------|------------------------|
| 5. HSA-5 | (Humán szérum albumin) |
|----------|------------------------|

MATOLCSY ANDRÁS:

Monoklonális antitestek alkalmazása az akut leukaemiák diagnosztikájában

Az akut haemoblastosisok diagnosza napjainkban morfológiai és cytochemikai kritériumok alapján történik általában a FAB classificationnak megfelelően. Egyes esetekben elektronmikroszkópos, biokémiai, és cytogenetikai vizsgálatokat is végeznek. Az immunológia gyors fejlődése és a monoklonális antitestek térhódítása lehetővé tette, hogy az akut leukaemiákat a sejtfelszíni marker sajátosságaik bevonásával precízebben diagnosztizálhassuk. A standardizált monoklonális antitestek elterjedésével új dimenzio nyílt az akut haemoblastosisok osztályozásában, melynek alapja a sejtfelszíni differenciálódási markerek vizsgálata.

A POTE Kóronctani Intézet és az Internationale Gesellschaft für Chemo und Immunotherpaie munkacsoport valamint a Bécsi Egyetem Immunológiai Intézetében Knapp prof. által vezetett munkacsoportok közti szoros együttműködés során lehetőségünk nyílt arra, hogy 16 standardizált monoklonális antitesttel vizsgálatot végezzünk akut leukaemiás betegeken.

Az általunk használt monoklonális antitestek két csoportot alkotnak. Az első csoportba tartoznak a lymphoid differenciálódási markerek, míg a másik csoportot a myeloid sejtek ellen termelt monoklonális antitestek alkotják /monocyta, granulocyta, erythroid sejtek/.

A felszíni monoklonális antigének kimutatása indirekt immunfluorescentia illetve indirekt peroxidase módszerrel történik. A fluorescens módszert sejtsuspension, míg a peroxidase módszert cytocentrifugás preparátumokon végeztük. Első lépésként az egér hybridomában termelt monoklonális antitesteket hoztuk össze a leukaemiás sejtekkel, majd az incubálási idő elteltével többször mostuk a sejteket PBS-ben. Második lépésként a FITC-al vagy PO-val jelölt anti-egér immunoglobulint hoztuk össze a leukaemiás, első savóval már reagált sejtekkel. A FITC-al jelölt esetekben a kirétékelést fluorescens miroszkóppal végeztük.

Az akut lymphoblastos leukaemia /ALL/ heterogén csoportja az akut haemoblastosiseknek, mely morfológiai és cytochemiai markereik setítségével biztonsággal elkülöníthető más akut haemoblastosisektől. A FAB klassificatio az ALLT-t három típusra osztja morfológiai sajátosságai alapján, azonban T, B vagy O sejtes eredetére /eltekintve az L₃ Burkitt tipustól/ és a sejtek érettségi fokára nem ad magyarázatot. Ebből eredően az L₁ és L₂ típusba sorolt leukaemiák rendkívül heterogén populációt alkotnak, melyet az is bizonyít, hogy egy morfológiai csoporton belül az egyes betegségek kórlefolyása eltérő.

A felszíni differenciálódási markerek segítségével lehetőség nyílt arra, hogy az ALL-t funkcionális sajátosságai alapján is csoportosíthassuk. Ennek megfelelően 5 subtípusra oszthatjuk az ALL-t.

1. / nonT nonB ALL: Ia+ cALLA⁻ E- sIg- Leu1- OKT-
2. / Pre T ALL: Ia+ cALLA+ Leu-1+ E- OKT-9,10+
3. / T ALL: Ia- cALLA- Leu-1+ OKT-8,4,3+
4. / Pre B ALL: Ia+ cALLA+ sIg- E-
5. / B ALL: Ia+ sIg+ cIg+ E-

Az általunk vizsgált haemoblastosisek közül 5 bizonyult ALL-nak, melyeket a FAB classificatio szerint L₂-nek diagnosztizáltunk. Az 5 ALL közül 4 volt pozitív cALLA-val, három hordozott Ia intigént és 1 esetben találtunk Leu-1 pozitivitást. A 2. sz. ábra alapján az első esetet /cALLA+, Ia+, Leu-1+/ pre T típusnak tartjuk, míg a másik négy típust a non-T non-B ALL csoportba tartozik. A nonT nonB típuson belül a 2. számú esetet éretlenebbnek tartjuk a többi háromnál, mivel ebben az esetben a cALLA antigén hiányzik, és csak a legkorábban megjelenő Ia antigént hordozzák a sejtek. A nonT nonB esetekben jelenlévő VIB-C5 /pre B/ pozitivitás intenzitása rendkívül gyenge volt.

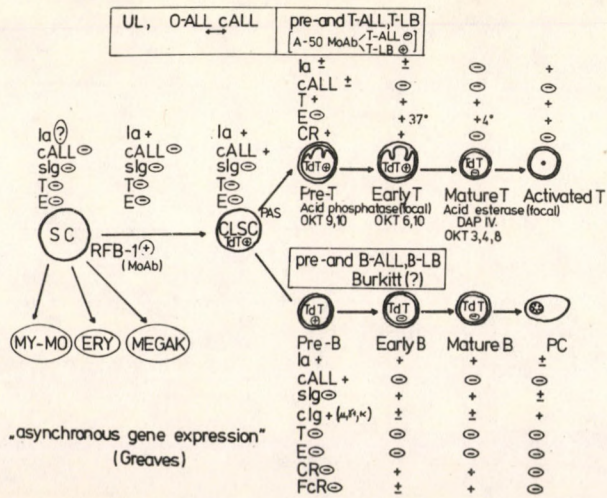
Az akut leukaemiák lymphoid illetve myeloid eredetének elkülönítésére, valamint a myeloid leukaemiák M₁ és M₆ közé való besorolását a myeloid enzimek cytochemiai vizsgálatával végzik.

Az acut lymphoid és myeloid leukaemiák elkülönítése a peroxidase és SBB technikával az esetek többségében nem ütközik nehézségbe, azonban ezen vizsgálatok alátámasztása monoklonális antitest analízissel megnyugtató adatként szolgál a terápiát végző klinikus számára. A myeloid leukaemiák M₁ és M₂ közé történő besorolása a jól beállított peroxidase és Naphtol acetat esterese reakciók mellett sem egyértelmű minden esetben. A felszíni monoklonális antitestek ezen vitatott esetekben döntő fontosságú lehet.

MONOCLONALIS ANTITESTEK

VID-1	HLA-DR Ia
VIL-A1	cALLA
VIP-2b	OKT-10
VIP-1	OKT-9
Leu-1	pre-T, T
Leu-2	OKT-8, suppressor
Leu-3	OKT-4, helper
VIT-6	OKT-6, thymus
9-C-4	pan-T
VIB-C5	pre-B, B
<hr/>	
VIM-D5	granulocyta
VIM-2	granulocyta, mo.
VIM-12	adherens sejtek
VIM-D2	monocyta
12-C-3	monocyta
VIE-G4	erythroid

1. táblázat



2. táblázat

ALL VIZSGÁLATA MONOCLONÁLIS ANTITESTEKKEL

		VIL-A1	VID-1	VIP1	VIB-2b	Leu-1	Leu-2	Leu-3	VIB-C5	VIT-6	
1.	L ₂	⊕	⊕	—	—	⊕	—	—	—	—	pre T
2.	L ₂	—	⊕	—	—	—	—	—	—	—	nonT nonB
3.	L ₂	⊕	—	ND.	ND.	—	ND.	ND.	⊕ [*]	ND.	nonT nonB
4.	L ₂	⊕	⊕	—	—	ND.	ND.	ND.	⊕ [*]	ND.	nonT nonB
5.	L ₂	⊕	—	—	—	—	—	—	⊕ [*]	—	non T non B

* gyenge pozitivitás

3. táblázat

MYELOID LEUKAEMIÁK VIZSGÁLATA
MONOCLONÁLIS ANTITESTEKKEL

		VIM-D5	VIM-2	VIM-12	12-C-3	VIM-D2	VIE-G4	
1.	M2	⊕	⊕	—	—	—	—	AML
2.	M2	⊕	—	—	—	—	—	AML
3.	M2	⊕	⊕	—	—	—	—	AML
4.	M2	⊕	⊕	—	⊕	—	—	AMMOL ?
5.	M2	⊕	⊕	—	—	—	—	AML
6.	M2	⊕	⊕	—	—	—	—	AML
7.	M4	⊕	⊕	—	—	—	—	AMMOL
8.	M4	⊕	⊕	—	⊕	—	—	AML ?
9.	M4	⊕	⊕	—	⊕	⊕	—	AMMOL

4. táblázat

CML-BC VIZSGÁLTA MONOCLONÁLIS ANTITESTEKKEL

		VIM D5	VIM 2	12 C 3	VIE G4	VIL A1	
1.	CML-BC	⊕	⊕	—	—	—	myeloblaszt
2.	CML-BC	⊕	⊕	—	—	—	myeloblaszt
3.	CML-BC	⊕	⊕	—	—	—	myeloblaszt
4.	CML-BC	⊕	⊕	—	—	—	myeloblaszt
5.	CML-BC	⊕	⊕	—	—	—	myeloblaszt
6.	CML-BC	—	—	—	—	⊕	lymphoblaszt

5. táblázat

Kilenc myeloid leukaemiát vizsgáltunk, mely a morfológiai és cytochemiai vizsgálatok alapján 6 M₂ és 3 M₄ subtípusokra osztottak. A monoklonális antitestek közül minden esetben jellemző volt a myeloid sejtekre a VIM-D5 pozitivitás és egy esetet kivéve a VIM-2 pozitivitás. Két esetben nem egyezett a cytochemiai és a cytochemiai és monoklonális antitestekkel végzett vizsgálat eredménye: 12-C-3 pozitivitást találtunk M₂-ben, valamint egy M₄-es csoportban nem észleltünk monocyta sávóval pozitivitást.⁴

Hat CML-blastos crisisében vizsgáltuk monoklonális antitestekkel a blastok eredetét, mely az irodalmi adatok alapján lehet myeloid, lymphoid, erythroid egyaránt. Öt esetben egyértelműen myeloblastoknak bizonyultak az éretlen sejtelemek a monoklonális antitestekkel és az enzimreakciókkal. Egy esetben felszíni markerként VIL-A1 /CALLA/ pozitivitást találtunk, mely alapján a blastos crisis lymphoidnak bizonyult.

• A monoklonális antitestek alkalmasak az iránytadó morfológiai és cytochemiai diagnózis kiegészítésére, megerősítésére, valamint a cytologiailag problémás enzim negatív blastok természetének eldöntésére. Ugyancsak segítséget nyújthat a pancytopeniával kezdődő esetek és a relapsusok korai felismerésében.

III. Hormonokkal reagáló ellenanyagok

- | | |
|-----------|----------------------------|
| 1. ACTH-4 | (Adrenocorticotrop hormon) |
| 2. VSP-3 | (Vasopressin) |

IV. Speciális célú MEA-termékek

- | | |
|-----------|--|
| 1. RSA-1 | (Patkány szérum albumin) |
| 2. GPA-11 | (Szarvasmarha leukozis vírus glikoprotein) |
| 3. T1-10 | (Tubulin) |
| 4. GG-3 | (Kecske gamma globulin) |

EMBERI FEHÉRJÉK (1983)

A monoklonális ellenanyagok segítségével analitikailag tiszta (jódozásra alkalmas) fehérjék is előállíthatók. 1983-ban az alábbi humán fehérjék forgalmazása történik:

1. Alfa-1-foetoprotein (AFP)
2. Myelin bázikus fehérje (MBP)

A jelenleg forgalmazott monoklonális ellenanyagok ára 20-40 Ft/ug között változik.
A tisztított AFP ára 1200 Ft/ug, a tisztított MBP ára 1500 Ft/100 ug.

További információkért kérjük forduljanak:
Dr. ANDÓ ISTVÁN tudományos munkatárshoz
MTA Szegedi Biológiai Központ
Genetikai Intézet
Szeged, Odesszai körút 62.
Telefon: (62) 13-911/104
Telex: 82-442

